

Kualitas Semen Beku Sapi Friesian Holstein Produksi BIB Lembang dengan Lama Waktu Thawing yang Berbeda

The Quality of Friesian Holstein Cream Frozen Cement Production of BIB Lembang With a Different Thawing Time

Harissatria* dan Syahro Ali Akbar

Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Mahaputra Muhammad Yamin
Kampus I, Jl. Jenderal Sudirman No. 6, Kota Solok. Telp (0755) 20565

*e-mail: haris_satria85@yahoo.com

ABSTRACT

This study aims to determine the effect of thawing time on the quality of frozen semen of Friesian Holstein cattle produced by BIB Lembang which is stored in UPTD Puskesmas Padang Panjang. This study used an experimental method with a completely randomized design (CRD). Consists of 3 treatments, namely thawing time of 1 second, 10 seconds and 20 seconds at 38°C and each treatment was repeated 5 times. The material used in this study was 15 straws of frozen semen from FH cattle produced by BIB Lembang with the same bull code. This research was conducted at the Laboratory of Animal Biotechnology, Andalas University Padang. The results showed that the thawing duration of 1 second, 10 seconds and 20 seconds gave no significant difference ($P > 0.05$) to the percentage of life, percentage of motility and percentage of abnormalities in frozen semen of FH cows thawed at 38°C. Based on the research results, it can be concluded that frozen semen from FH cattle produced by BIB Lembang, thawed at 38°C for 1 second, 10 seconds and 20 seconds is still suitable for IB.

Key words : thawing, survival rate, motility, abnormality, FH

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama thawing terhadap kualitas semen beku sapi Friesian Holstein produksi BIB Lembang yang di simpan di UPTD Puskesmas Kota Padang Panjang. Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Terdiri dari 3 perlakuan yaitu lama thawing 1 detik, 10 detik dan 20 detik pada suhu 38°C dan setiap perlakuan diulang sebanyak 5 kali. Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen beku sapi FH produksi BIB Lembang sebanyak 15 straw dengan kode pejantan yang sama. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Ternak Universitas Andalas Padang. Dari hasil penelitian dapat diketahui bahwa lama thawing 1 detik, 10 detik dan 20 detik memberikan perbedaan tidak nyata ($P > 0,05$) terhadap persentase hidup, persentase motilitas dan persentase abnormalitas pada semen beku sapi FH yang di thawing pada suhu 38°C. Berdasarkan dari hasil penelitian, dapat disimpulkan semen beku sapi FH produksi BIB Lembang yang di thawing pada suhu 38°C selama 1 detik, 10 detik dan 20 detik masih layak untuk di IB.

Kata kunci : thawing, persentase hidup, motilitas, abnormalitas, FH

PENDAHULUAN

Selain daerah dari luar pulau Jawa, pemeliharaan sapi perah masih masih bersifat semi intensif serta manajemen dalam pengelolaannya reproduksinya masih kurang bagus seperti di daeha Kota Padang Panjang. Teknologi Inseminasi Buatan (IB) merupakan teknologi reproduksi yang sering digunakan untuk perkawinan sapi perah Friesian Holstein (FH) karena dapat meningkatkan potensi genetik dan efisiensi reproduksi (Vilakazi dan Webb, 2004) serta bias mempercepat kebuntingan (Said *et al.*, 2005). Selanjutnya

untuk mengupayakan keberlanjutan produksi dan ketersediaan susu sapi perah, maka sapi perah betina harus mampu melahirkan anak satu kali dalam setahun agar sapi perah bisa laktasi setiap tahun. Berdasarkan hal tersebut, program IB pada sapi perah merupakan teknologi yang tepat untuk mendukung keberlanjutan dari produksi susu sapi perah sepanjang tahun.

Sumatera Barat memiliki sapi perah yang berjumlah 722 ekor yang tersebar di beberapa daerah seperti; Kabupaten 50 Kota, Tanah Datar, Agam, Kota Padang, Payakumbuh, Sawahlunto, Bukittinggi

(Reswati *et al.*, 2014). Kota Padang Panjang memiliki jumlah populasi sapi perah 338 ekor yang tersebar di beberapa kelompok tani, kemudian ada juga yang milik pribadi (Dinas Pangan dan Pertanian Kota Padang Panjang, 2017). Selanjutnya, berdasarkan catatan dari Puskesmas Kota Padang Panjang, seluruh ternak sapi perah yang ada di Kota Padang Panjang semuanya di kawinkan dengan cara Inseminasi Buatan menggunakan bibit semen beku sapi perah dari BIB Lembang. Penggunaan semen beku dalam proses inseminasi buatan memiliki keunggulan diantaranya dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama jika di tangani dengan baik dan benar seperti mengontrol ketersediaan N₂ cair agar tidak kurang di dalam container dimana tempat semen beku itu di simpan. Selanjutnya memiliki kelemahan yaitu kualitas semen beku dapat menurun setelah proses thawing karena melewati berbagai suhu ekstrim yang bias merusak kualitas semen beku sebelum pelaksanaan IB (Komariah *et al.*, 2013).

Kualitas semen beku yang baik sebelum di IB harus memiliki jumlah spermatozoa fertil yang memadai. Pengujian terhadap kualitas dan fertilitas semen beku merupakan tahapan akhir dari rangkaian pengujian kualitas spermatozoa sebelum di IB. Untuk menentukan spermatozoa layak untuk IB, kualitas spermatozoa diperiksa dengan beberapa parameter diantaranya persentase hidup, motilitas dan abnormalitas (Foote, 2002).

Berdasarkan metode tersebut, persentase hidup, motilitas dan abnormalitas semen beku merupakan kriteria penting pada evaluasi kualitas semen beku sebelum dilakukan proses IB. Penilaian persentase hidup, motilitas, dan abnormalitas semen beku dapat diperiksa segera setelah thawing atau sebelum pelaksanaan IB, tetapi penilaian ini tidak pernah dilakukan oleh petugas inseminator di lapangan karena keterbatasan alat dan pengetahuan serta bervariasinya kualitas semen beku post thawing pada sapi perah. Selanjutnya akibat penanganan thawing seperti lama thawing dan suhu thawing yang berbeda pada setiap pelaksanaan IB oleh inseminator di lapangan, dapat menghasilkan beragamnya

tingkat keberhasilan kebuntingan sapi betina (Salim *et al.*, 2012).

Gordon (2002) menyatakan, bahwa suhu thawing yang menghasilkan nilai persentase hidup, motilitas dan abnormalitas spermatozoa post thawing optimum adalah pada suhu 30°C-37°C selama 30 detik. Al-Badry (2012) juga menyatakan, bahwa thawing semen beku dengan suhu 5°C dengan hasil berbeda nyata terhadap thawing bersuhu 37°C dan 60°C. Semen beku yang dithawing dalam air 5°C menghasilkan persentase motilitas yang rendah jika dibandingkan dengan thawing suhu 37°C maupun 60°C. Selanjutnya, terlihat penurunan motilitas pada perlakuan dengan suhu 5°C dan 15°C (Salim *et al.*, 2012). Selanjutnya durasi thawing yang terlalu lama juga bias menyebabkan aktivitas metabolisme meningkat dan berlangsung secara massal, sehingga terjadi peningkatan produksi asam laktat dan bias bersifat toksik bagi spermatozoa sehingga berakibat pada rendahnya daya gerak atau motilitas spermatozoa (Watson, 1996).

Direktorat Jenderal Peternakan menyatakan standarisasi metode thawing yaitu penggunaan air suhu 37°C selama 30 detik sesuai Standart Operasional Pekerjaan (SOP) Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB). Namun, faktor kemudahan pelaksanaan menjadi pertimbangan bagi inseminator di lapangan dalam pelaksanaan thawing antara lain penggunaan air es, penggunaan air sumur, air PDAM, pemutaran ditelapak tangan serta suhu dan lama yang berbeda-beda.

Pentingnya metode Thawing yang baik dan tepat, merupakan kunci keberhasilan pelaksanaan IB di lapangan, namun dilapangan thawing dan manajemen pengelolaan semen beku oleh inseminator masih berbeda-beda, maka dari itu dapat dirumuskan permasalahan sejauh mana pengaruh lama thawing terhadap kualitas semen beku sapi Friesian Holstein (FH) produksi BIB Lembang yang disimpan di UPTD Puskesmas Kota Padang Panjang terhadap, persentase hidup, motilitas dan abnormalitas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama thawing terhadap kualitas semen beku sapi Friesian Holstein (FH) produksi BIB Lembang yang disimpan di UPTD Puskesmas Kota Padang Panjang

terhadap, persentase hidup, motilitas dan abnormalitas spermatozoa.

MATERI DAN METODE

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen beku sapi Friesian Holstein (FH) produksi BIB Lembang Tahun 2016 dengan kode pejantan seragam, yang di simpan di UPTD Puskesmas Kota Padang Panjang sebanyak 15 buah straw. Semen beku dimasukkan dalam container 5 liter yang berisi nitrogen cair dan selanjutnya dibawa ke Laboratorium Bioteknologi Ternak Universitas Andalas Padang untuk dilakukan pengujian kualitas semen beku. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari, aquabidestilata pro injectionem 500 ml, eosin microscopy 2%, Sodium Chloride 500 ml dan Nacl 3 %. Sedangkan peralatan yang digunakan adalah termometer, mikroskop electron ziss, cover glass 0.13-0.17 mm steril, objek glass 1 -1.2 mm steril, hemocytometer 0.0025 mm², petridish 6 cm x 15 mm, mikropipet P 1000, gunting stainless, pinset stainless, test tube iwaki pyrex 10 ml, Bunsen dan stopwatch.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen di Laboratorium dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan waktu thawing sebagai perlakuan yaitu P0 (1 detik), P1 (10 detik) dan P2 (20 detik) dan 5 straw semen beku sebagai ulangan. Bila F hitung lebih besar dari F tabel 5%, maka analisis dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan's New Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1995).

Prosedur penelitian yaitu semen beku sapi FH dalam bentuk straw 0,25 ml yang diperoleh dari Puskesmas Kota Padang Panjang dibawa ke Laboratorium Bioteknologi Ternak Universitas Andalas Padang menggunakan kontainer 5 liter yang berisi N₂ Cair. Straw semen beku sapi FH kemudian dibagi menjadi 3 perlakuan waktu thawing, yakni 5 straw dithawing dalam air 38°C selama 1 detik, 5 straw di thawing dalam air 38°C selama 10 detik dan 5 straw lainnya di thawing dalam air 38°C selama 20 detik. Selanjutnya masing-masing straw dan perlakuan dilakukan pemeriksaan kualitas mikroskopis dengan cara

mengambil beberapa tetes semen dengan pipet tetes, ditetaskan di atas gelas objek kemudian ditambah dengan satu tetes eosin 2% dan dibuat preparat dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100 x yang terkoneksi kepada komputer. Penghitungan persentase hidup spermatozoa dilakukan dengan cara menghitung spermatozoa yang tidak menyerap zat warna dalam satu bidang pandang di bagi 200 x 100%. Pengamatan motilitas dilakukan dan dilihat dibawah mikroskop berdasarkan gerakan spermatozoa yang hidup dan bergerak maju/progresif. Data diperoleh dengan cara meneteskan sampel semen pada kamar hitung kemudian ditutup dengan cover glass lalu diamati di bawah mikroskop dengan perhitungan sebagai berikut : 90% : Bergerak sangat aktif atau cepat, gelombang besar dan bergerak cepat ; 70-85% : Bergerak aktif/cepat, ada gelombang besar dengan gerakan massa yang cepat. 40-65% : Bergerak agak aktif/agak cepat, terlihat gelombang tipis dan jarang serta gerakan massa yang lambat. 20-30% : Bergerak kurang aktif/ kurang cepat, tidak terlihat gelombang, hanya gerakan individual sperma. 10% : Gerakan individual sperma (sedikit sekali gerakan individual sperma atau tidak ada gerakan sama sekali (mati). Pengamatan abnormalitas spermatozoa dilakukan dengan cara meneteskan satu tetes semen di atas gelas obyek, dan tambahkan beberapa tetes eosin 2% kemudian di buat preparat selanjutnya semen disebar, kemudian difiksasi, setelah itu diangin-anginkan dengan menggunakan api bunsen supaya mempercepat pengeringan. Setelah kering dilakukan pengamatan abnormalitas spermatozoa. Abnormalitas yang dihitung adalah abnormalitas kepala terlalu besar, kepala terlalu kecil, kepala ganda (duplicate head), ekor melingkar dan ekor ganda.

Sesuai dengan pengamatan mikroskopis spermatozoa di prosedur penelitian tersebut maka parameter yang di ukur dalam penelitian ini adalah :

Persentase hidup (%). Diukur dengan menggunakan rumus (Hafez *et al.*, 2000) :

$$\text{Persentase sperma hidup} = \frac{\sum \text{sperma yang tidak terwarnai}}{\text{total jumlah sperma yang dihitung}} \times 100\%$$

Persentase motilitas (%). Diukur dengan menggunakan rumus (Partodihardjo, 1992) :

$$\text{Persentase motilitas} = \frac{\sum \text{sperma yang progresif}}{\sum \text{sperma yang diamati}} \times 100\%$$

Persentase abnormalitas (%). Diukur dengan menggunakan rumus (Hafez *et al.*, 2000) :

$$\text{Persentase abnormalitas} = \frac{\sum \text{sperma yang abnormal}}{\text{total jumlah sperma yang dihitung}} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh lama thawing semen beku terhadap kualitas spermatozoa sapi FH dapat dilihat pada Tabel 1 berikut :

Tabel 1. Pengaruh lama thawing semen beku terhadap kualitas spermatozoa sapi FH

Peubah	Lama thawing (detik)		
	1	10	20
Persentase hidup	62,80 ± 2,17	56,00 ± 13,87	13,10 ± 0,82
Persentase motilitas	72,00 ± 6,47	69,80 ± 7,12	12,20 ± 1,25
Persentase abnormalitas	66,90 ± 6,07	63,00 ± 2,74	12,70 ± 0,27

Keterangan: berbeda tidak nyata (P > 0,05)

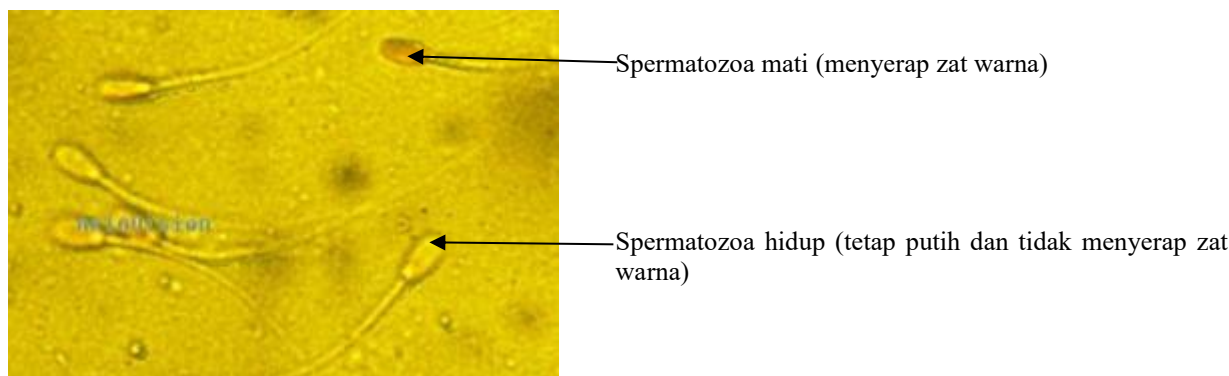
Persentase Hidup

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa lama thawing berbeda tidak nyata (P > 0,05) terhadap persentase hidup semen beku sapi FH produksi BIB Lembang. Hal ini diduga disebabkan karena thawing pada waktu 1 detik, 10 detik dan 20 detik sudah mampu untuk mencairkan kembali semen beku yang ada di dalam straw. Selanjutnya hal ini juga bisa disebabkan karena jenis bahan pengencer yang ada dalam semen beku adalah sama yaitu bahan pengencer dari susu skim. Penggunaan bahan pengencer yang sama pada jenis semen beku yang sama akan mengakibatkan kualitas semen beku seperti persentase hidup, relatif sama juga.

Hal ini sesuai dengan pendapat Rizal (2009) yang menyatakan bahwa persentase hidup semen beku setelah thawing tidak melebihi 60 detik yang menggunakan susu skim rata-rata persentase hidupnya 78,20% ± 2,21. Selanjutnya Supriatna dan Pasaribu (1992) menyatakan bahwa penggunaan bahan pengencer yang sama dengan waktu thawing 10-30 detik tidak berpengaruh terhadap persentase hidup semen beku. Selanjutnya bahan pengencer susu skim mengandung karbohidrat dan merupakan senyawa yang dapat berperan sebagai krioprotektan ekstraseluler dan berfungsi untuk melindungi membran plasma sel dari kerusakan. Membran plasma sel atau akrosom yang tetap utuh akan memberikan pengaruh positif terhadap kualitas persentase hidup. Selanjutnya juga disebabkan

bahwa proses thawing atau pencairan kembali sebenarnya sudah dimulai semenjak straw dikeluarkan dari kontainer. Pengeluaran straw dari kontainer secara otomatis akan meningkatkan suhu thawing atau suhu lingkungan ±28-31°C dari suhu beku (-196°C) menuju suhu ruang (Utomo, 2010). Persentase hidup pada suhu thawing 38°C dan lama thawing 1 detik, 10 detik dan 20 detik menunjukkan bahwa semen beku sapi FH produksi BIB Lembang masih layak untuk dipakai dalam program inseminasi buatan (IB). Hal ini membuktikan bahwa semen beku yang disimpan di UPTD Puskesmas Kota Padang Panjang masih layak untuk di IB.

Persentase spermatozoa hidup dapat dihitung dengan melihat reaksi spermatozoa terhadap zat warna tertentu (eosin 2%), spermatozoa yang hidup tidak berwarna sedangkan spermatozoa yang mati akan menyerap warna (Salisbury and VanDemark, 1985). Hasil ini menunjukkan bahwa lama thawing dan suhu thawing penelitian ini tidak mempengaruhi persentase spermatozoa hidup tetapi cenderung menurun kualitasnya apabila thawing dilakukan dengan cepat. Selanjutnya menurut Toelihere, (2003) menyatakan bahwa semen yang baik memiliki persentase hidup diatas 50%. Untuk lebih jelasnya perbedaan spermatozoa hidup dan mati yang didapatkan dari hasil penelitian dapat dilihat pada Gambar 1 berikut ini.



Gambar 1. Spermatozoa mati dan spermatozoa hidup

Persentase Motilitas

Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa lama thawing berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) terhadap persentase motilitas semen beku sapi FH produksi BIB Lembang. Hal ini diduga disebabkan karena waktu thawing 1 detik, 10 detik dan 20 detik masih bisa mempertahankan motilitas semen beku sapi FH BIB Lembang dan masih layak untuk di IB. Sesuai dengan pendapat Anonimous (2004) menyatakan bahwa lama waktu thawing belum menimbulkan perubahan aktivitas pergerakan individu secara berarti antara perlakuan waktu thawing, disamping itu juga dinyatakan bahwa thawing akan menghasilkan motilitas yang baik jika dilakukan pada waktu 15–30 detik. Hasil penelitian ini sesuai dengan pendapat Said *et al.*, (2005) yang menyatakan bahwa semen beku yang dithawing dengan durasi 1–30 detik tidak terlalu mengalami kontak langsung dengan udara, sehingga stres spermatozoa tidak terlalu tinggi sehingga motilitas masih terjaga. Selanjutnya panjang pendeknya ukuran waktu thawing dibanding dengan reaksi metabolisme spermatozoa menyatakan bahwa semen harus segera di IB dalam waktu yang tidak lebih dari 5 menit (Toelihere, 1993).

Suhu thawing 38°C yang digunakan pada penelitian ini sesuai dengan suhu ideal bagi aktivitas spermatozoa, sehingga sperma motil terlihat lebih tinggi persentasenya. Selanjut nya, pada suhu 38°C berguna untuk mencegah cold shock (kejutan dingin) dan motilitas pada sapi akan meningkat pada suhu 38°C (Toelihere, 1993).

Hasil penelitian ini diperkuat oleh pendapat Senger (2003) yang menyatakan, bahwa teknik pemeriksaan motilitas spermatozoa yang sederhana dan paling banyak

digunakan yaitu pemeriksaan pada suhu 37°C – 38°C , karena menghasilkan motilitas spermatozoa yang lebih baik jika dibandingkan dengan pemeriksaan dibawah suhu 38°C . Al-Badry (2012) dalam penelitiannya menyatakan, bahwa thawing semen beku di dalam air 5°C menunjukkan hasil yang berbeda signifikan terhadap thawing didalam air bersuhu 37°C dan 60°C . Semen beku yang di thawing dalam air 5°C menghasilkan motilitas yang lebih rendah jika dibandingkan dengan thawing dengan air bersuhu 38°C maupun 60°C .

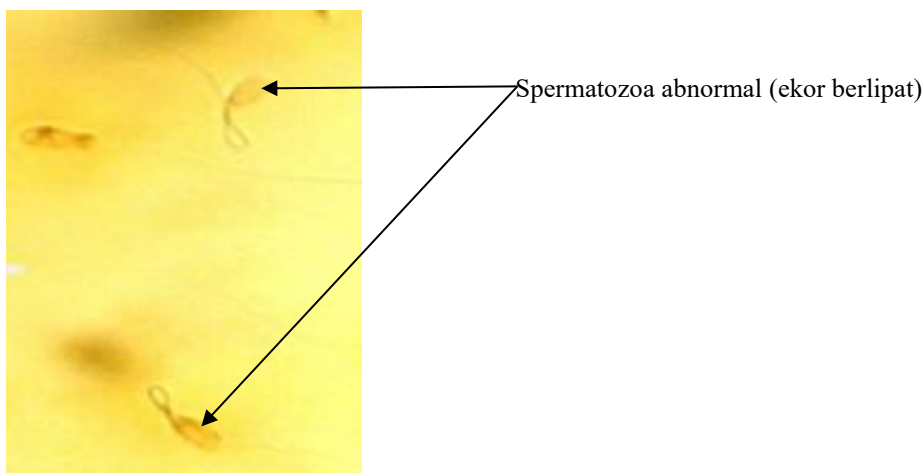
Hasil penelitian ini tidak berbeda jauh dengan penelitian Salim *et al.*, (2012) yang menggunakan semen beku dari tiga bangsa sapi, yaitu: sapi Bali, Madura dan PO serta digunakan tiga perlakuan suhu thawing yang berbeda, yakni: 5°C , 15°C dan 38°C . Dari penelitian tersebut dilaporkan persentase motilitas terbaik yaitu pada perlakuan dengan suhu 38°C .

Persentase Abnormalitas

Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa lama thawing memberikan perbedaan tidak nyata terhadap persentase abnormalitas semen beku sapi FH produksi BIB Lembang. Hal ini disebabkan karena dengan waktu thawing 1 detik, 10 detik dan 20 detik tidak akan merusak sel spermatozoa sehingga abnormalitasnya masih bagus. Sesuai dengan pendapat Barth (2007) maksimal abnormalitas spermatozoa yang layak untuk di IB dibawah 25%. Hal ini mengindikasikan bahwa lama thawing pada semen beku belum menyebabkan spermatozoa menjadi abnormal. Penyebabnya karena lama thawing pada perlakuan belum memberikan tekanan yang ekstrim secara mekanis sehingga spermatozoa tetap normal.

Selanjutnya Sari (2008) menyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa semen beku pada sapi Friesian Holstein pada suhu 34°C dengan lama thawing 30 detik sebesar 18,51%, sedangkan pada suhu 37°C dengan lama thawing 30 detik menghasilkan abnormalitas sebesar 15,10%. Abnormalitas yang ditemukan

dalam penelitian ini adalah abnormalitas primer, yang memang terjadi pada proses spermatogenesis dalam testis (Hafez *et al.*, 2000; Parkinson, 2004). Bentuk spermatozoa abnormalitas dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2 berikut ini :



Gambar 2. Spermatozoa Abnormal

SIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa waktu thawing (1 detik, 10 detik dan 20 detik) semen beku sapi FH pada suhu 38°C tidak memberikan pengaruh terhadap persentase hidup, persentase motilitas dan persentase abnormalitas spermatozoa.

SARAN

Diharapkan kepada petugas Inseminasi Buatan untuk lama thawing semen beku tidak lebih dari 20 detik dengan suhu 38°C, karena pada waktu dan suhu tersebut masih menghasilkan kualitas semen yang layak untuk IB.

DAFTAR PUSTAKA

Al-Badry, K. I. 2012. Effect of various thawing times and temperatures on frozen semen quality of Friesian Bulls in Iraq. *Int. J. Anim. Veter. Adv.* 4: 384-388.

Anonimus. 2004. Pelatihan Inseminator pada Sapi dan Kerbau. BIB Singosari, Malang. Dirjen Bina Produksi Peternakan, Indonesia. Malang, Jawa Timur.

Barth, A. D. 2007. Evaluation of Potential Breeding Soundness of the Bull. In: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 2nd Ed. Saunders, Elsevier, Inc. Philadelphia.

Foote, R. H. 2002. The History of Artificial Insemination: Selected Notes and Notables. *Am. Soc. J. Anim. Sci.* 80: 1-10.

Gordon, I. 2002. *Controlled Reproduction in Cattle and Buffaloes*. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Hafez . B., and E. S. E. Hafez. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th Edition. Reproductive Health Center. IVF Andrology Laboratory. Kiawah Island, South Carolina, USA.

- Komariah., I. Arifiantini, F. W. Nugraha. 2013. Kaji banding kualitas spermatozoa sapi Simmental, Limousin, dan Friesian Holstein terhadap proses pembekuan. *Buletin Peternakan*. 37(3): 143-147.
- Parkinson, T. J. 2004. Review: Evaluation of Fertility and Infertility in natural service bulls. *Vet. J.* 168: 215-229.
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Cetakan ke-3 Penerbit Mutiara Sumber Widia, Jakarta.
- Reswati., Jaswandi, dan E. Nurdin. 2014. Performa reproduksi sapi perah di Sumatera Barat. *Jurnal Peternakan Indonesia*. 16(3): 157-165.
- Rizal, M. 2009. Daya hidup spermatozoa epididimis sapi bali yang dipreservasi pada suhu 3-5°C dalam pengencer tris dengan konsentrasi laktosa yang berbeda. 14(2): 142-149
- Said, S., M. Gunawan, E. M. Kaiin, dan B. Tappa. 2005. Daya tahan hidup sperma cair sapi Simmental yang disimpan dalam straw pada temperatur 5°C. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.
- Salim. M. A., T. Susilawati, S. Wahyuningsih. 2012. Pengaruh metode thawing terhadap kualitas semen beku sapi Bali, sapi Madura dan sapi PO. *Agripet*. 12: 14-19.
- Salisbury, G. W., dan N. L. Van Demark. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi. Terjemahan R. Djanuar. Yogyakarta, Gadjah Mada University Press.
- Sari. N. S. 2008. Pengaruh Suhu dan Lama Thawing terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Fries Holland. Skripsi. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang.
- Senger, P. L. 2003. Pathways to Pregnancy and Parturition (2nd Edition). Cadmus Professional Communications. United State America. Pp 335-343.
- Steel, R. G. D., dan J. H. Torrie. 1995. Prinsip Dan Prosedur Statistika. Penterjemah Bambang Sumantri. Jakarta, Gramedia Pustaka.
- Suprijatna I., dan F. H. Pasaribu. 1992. In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio, dan Pembekuan Embrio. Bogor. Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor.
- Toelihere, M. R. 1993. Inseminasi Buatan Pada Ternak. Bandung, Angkasa.
- Toelihere, M. R. 2003. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Bandung, Angkasa.
- Utomo. S., dan E. Boquifai. 2010. Pengaruh temperatur dan lama thawing terhadap kualitas spermatozoa sapi dalam penyimpanan straw beku. *Sains Peternakan* 8 (1): 22-25.
- Vilakazi, D. M., and E. C. Webb. 2004. Effect of age and season on sperm morphology of Friesland Bulls at an artificial insemination centre in South Africa. *South Afric. J. Anim Sci*: 34: 62- 69.
- Watson, P. F. 1996. Cooling of spermatozoa and freezing capacity. *Reprod. Dom. Anim.* 31: 135 - 140.